

**Barbara Marić**

**Koncentracija malondialdehida i katalitička  
aktivnost katalaze u uzorcima seruma, EDTA,  
citratne i heparinske plazme**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju i u Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr .sc. Marije Grdić Rajković i suvoditeljstvom izv .prof .dr .sc. Ane-Marije Domijan.

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. ANTIKOAGULANSI .....	1
1.1.1. Heparin .....	3
1.1.2. EDTA ( Etilendiamintetraoctena kiselina ) .....	4
1.1.3. Citrat .....	5
1.1.4. Serum .....	6
1.2. OKSIDACIJSKI STRES.....	7
1.2.1. Slobodni radikali .....	7
1.2.2. Lipidna peroksidacija .....	7
1.2.3. Malondialdehid ( MDA ) .....	8
1.2.4. Oksidacijski stres i antioksidacijska obrana organizma .....	9
1.2.5. Katalaza .....	10
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>13</b>
3.1. ISPITANICI .....	13
3.2. UZORCI.....	13
3.3. KEMIKA LIJE I OTOPI NE.....	14
3.3.1. Kemikalije .....	14
3.3.2. Otopine.....	14
3.3.2.1. Postupak priprave otopina za određivanje MDA.....	14
3.3.2.2. Postupak priprave otopina za određivanje enzima Katalaza .....	16

3.4.	APARATURA.....	17
3.4.1.	Dijelovi korištenog HPLC-a .....	17
3.5.	METODE.....	18
3.5.1.	Princip metode određivanja MDA.....	18
3.5.2.	Postupak određivanja MDA.....	19
3.5.3.	Princip metode određivanja enzima katalaza .....	19
3.5.4.	Postupak određivanja enzima katalaza .....	20
3.6.	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA .....	20
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>21</b>
4.1.	Rezultati određivanja MDA .....	22
4.2.	Rezultati određivanja enzima katalaze.....	31
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>33</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>34</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>37</b>

# 1. UVOD

## 1.1. ANTIKOAGULANSI

Koagulacija je proces zgrušavanja koji se sastoji od serije kompleksnih sekvencijskih reakcija u kojima sudjeluju određeni plazmatski glikoproteini nazvani faktori zgrušavanja (Labar i sur., 2007). U prisutnosti kalcija neaktivni faktori zgrušavanja prevode se u aktivne, sa prokoagulatornim svojstvima.

Koagulacija nastupa u roku pola sata nakon vađenja krvi zbog utjecaja fibrinogena i ostalih faktora koagulacije. Puna krv se tada razdvaja na krvni ugrušak koji zaostaje na dnu epruvete i na bistru žućkastu tekućinu iznad ugruška koju nazivamo serum. Potpuno odjeljivanje postiže se centrifugiranjem. Krvni ugrušak sastavljen je od krvnih stanica eritrocita, leukocita i trombocita te fibrinogena, dok je serum dio krvi koji definiramo kao izvanstanična tekućina (Kujundžić i sur., 2003).

Koagulaciju je moguće spriječiti dodatkom antikoagulansa i tada ne dolazi do zgrušavanja krvi. U tom slučaju izvanstaničnu tekućinu nazivamo plazma, a stanice ostaju zasebne i mogu se koristiti za analize nakon provedenog centrifugiranja. Razlika plazme i seruma jest u faktorima koagulacije koji su prisutni samo u plazmi, a ovisno o korištenim antikoagulansima razlikujemo EDTA plazmu, heparinsku plazmu, citratnu plazmu. Pri mjerenju nekih biokemijskih parametara, postoji razlika koja ovisi o tome vrše li se analize u serumu ili u plazmi ([www.synlab.hr](http://www.synlab.hr)). Nekoliko takvih parametara prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Prikaz nekih biokemijskih parametara kod kojih se vrijednosti razlikuju u plazmi i serumu (tablica preuzeta iz literaturnog navoda Burtis CA i sur., 2012).

Vrijednosti u plazmi koje su <b>više</b> u odnosu na serum (%)	Kalcij	0,9
	Kloridi	0,2
	Laktat dehidrogenaza	2,7
	Ukupni proteini	4,0
Nema razlike u vrijednosti između seruma i plazme (%)	Bilirubin	
	Kolesterol	
	Kreatinin	
Vrijednosti u plazmi koje su <b>niže</b> u odnosu na serum (%)	Albumin	1,3
	Alkalna fosfataza	1,6
	Aspartat aminotransferaza	0,9
	Bikarbonati	1,8
	Kreatin kinaza	2,1
	Glukoza	5,1
	Fosfor	7,0
	Kalij	8,4
	Natrij	0,1
	Urea	0,6

### 1.1.1. Heparin

Heparin je najrašireniji antikoagulans korišten za kemijske i hematološke analize. Sastoji se od mukopolisaharida sa brojnim sulfatnim i karboksilnim skupinama, dostupan u obliku natrijevih, kalcijevih, litijevih te amonijevih soli. Spomenuti antikoagulans ubrzava djelovanje antitrombina III, koji neutralizira trombin i time sprječava nastanak fibrina iz fibrinogena. Većina epruveta sadrži 0,2 mg heparina po mililitru krvi. Nedostatci ovog antikoagulansa su visoka cijena, inaktivacija kisele fosfataze, te nemogućnost korištenja hepariniziranih uzoraka za lančanu reakciju polimerazom (PCR) (Burtis CA i sur., 2012). Epruveta koja sadrži heparin ima zeleni čep (Slika 1).



**Slika 1.** - Epruveta koja sadrži antikoagulans heparin.

### 1.1.2. EDTA ( Etilendiamintetraoctena kiselina )

Natrijeve i kalijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline snažni su antikoagulansi jer vežu na sebe kalcijeve ione i veoma su pogodni za rutinsku hematologiju. Preporuka Internacionalnog komiteta za standardizaciju u hematologiji je uporaba dikalijeve soli EDTA u koncentraciji  $1,5 \pm 0,25$  mg/mL krvi. Koncentracije veće od 2 mg/mL uzrokuju smanjenje hematokrita, povećanu prosječnu koncentraciju hemoglobina (MCHC), razaraju trombocite i lažno povećavaju njihov broj (Labar i sur.,2007). EDTA zbog svog kelatirajućeg svojstva dvovalentnih metalnih kationa, inhibira alkalnu fosfatazu, kreatin kinazu i leucin aminopeptidazu. Također zbog kelatiranja kalcija i željeza, EDTA nije pogodan za njihova mjerenja fotometrijskim te titracijskim tehnikama. Kao antikoagulans, vrlo malo utječe na druge kliničke pretrage, no prijavljeno je da snižuje kolesterol za 3 do 5% (Burtis CA i sur., 2012). Epruvete koje sadrže EDTA imaju čep ljubičaste boje (Slika 2).



**Slika 2.** Epruveta koja sadrži antikoagulans EDTA.



### 1.1.3. Citrat

Natrijev citrat rabi se za uzimanje krvi za ispitivanje poremećaja hemostaze. Jedan volumen otopine natrijeva citrata (32 g/L) pomiješa se sa devet volumena krvi. Natrijev citrat se rabi i pri vađenju krvi za određivanje brzine sedimentacije eritrocita (omjer krvi i antikoagulansa je 5:1). Zbog kelatiranja kalcija i molibdena, citrat nije prikladan antikoagulans za mjerenje ovih elemenata. Također, inhibira aminotransferaze i alkalnu fosfatazu (Burtis CA i sur., 2012). Epruvete koje sadrže citrat imaju čep plave boje (Slika 3).



**Slika 3.** Epruveta koja sadrži antikoagulans citrat.

#### 1.1.4. Serum

Serum se definira kao tekući odjeljak krvi koji ostane nakon završenog procesa koagulacije. On je uzorak izbora za mnoge analize. Nakon vađenja krvi u epruvete koje ne sadrže aditive, serum mora odstajati 30 minuta da se završi proces koagulacije prije nego se krene u daljnji proces analize (Burtis CA i sur., 2012). Serum se dobiva vađenjem krvi u epruvete sa crvenim ili žutim čepom (Slika 4).



**Slika 4.** Epruvete koje ne sadrže antikoagulans.

## **1.2. OKSIDACIJSKI STRES**

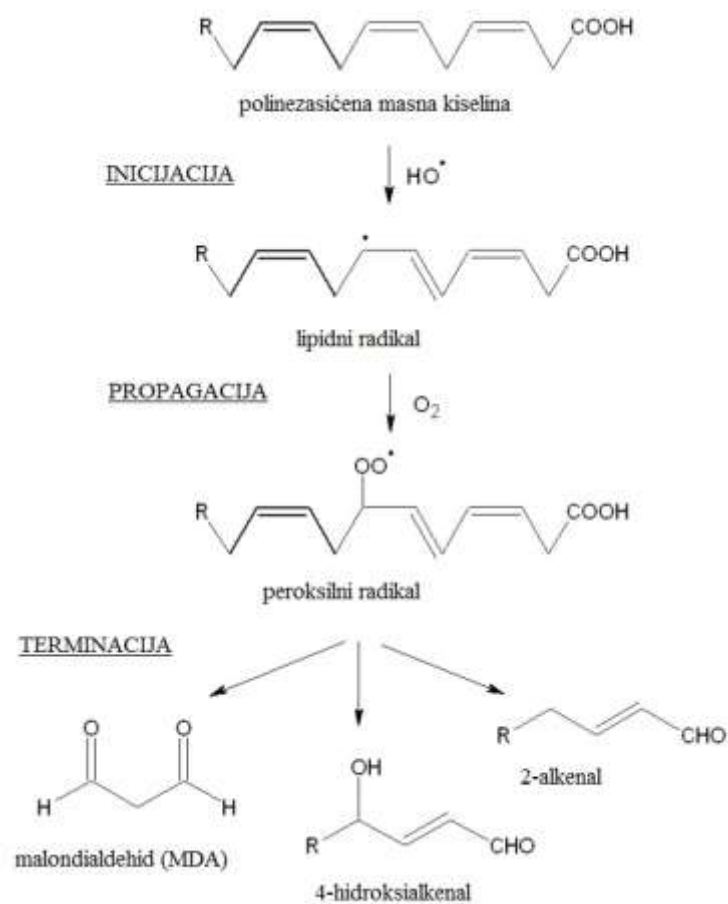
### **1.2.1. Slobodni radikali**

Slobodni radikali su kemijske vrste koje imaju jedan nespareni elektron u vanjskoj orbitali. Budući da imaju jedan nespareni elektron oni su obično visoko reaktivne elektrofilne vrste koje napadaju različita mjesta kao što su dvostruke C=C veze u polinezasićenim masnim kiselinama (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009). Nespareni elektron može se povezati s gotovo svim atomima, ali od biološkog interesa su atomi kisika, dušika i ugljika. U reaktivne kisikove vrste (ROS – reactive oxygene species) ubrajaju se superoksidni radikal, hidroksilni radikal, hidroperoksidni radikal, vodikov peroksid, peroksil radikal, singlet kisik (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

### **1.2.2. Lipidna peroksidacija**

Lipidna peroksidacija je lančana reakcija posredovana slobodnim radikalima, koja jednom započeta, rezultira oksidativnim propadanjem polinezasićenih lipida. Najčešće ciljane molekule su lipidi kao komponente biološke membrane. Te reakcije mogu biti započete ili pojačane brojnim toksičnim produktima uključujući endoperokside i aldehide. Proces lipidne peroksidacije je jedan oblik oksidativne promjene polinezasićenih masnih kiselina koji rezultira nastankom citotoksičnih produkata (Bukan i sur., 2003).

Lančane reakcije lipidne peroksidacije započinju slobodnim radikalom koji oduzima vodikov ion polinezasićenom lipidu i na taj način stvara lipidni radikal. Reakcija se širi dodatkom kisika što rezultira stvaranjem peroksilnog radikala i lipidnog hidroperoksida. Preuređenjem jednog elektrona dolazi do razgradnje lipida. Malondialdehid, jedan od nastalih spojeva, topljiv je i pojavljuje se u cirkulaciji te ga je moguće izmjeriti (Slika 5). Reakcija može biti prekinuta antioksidansima (npr. vitamin E koji donira jedan elektron u dvama susljednim stupnjevima stvarajući stabilni oksidirani spoj).



**Slika 5.** Proces lipidne peroksidacije

### 1.2.3. Malondialdehid ( MDA )

MDA je jedan od najpoznatijih sekundarnih produkata lipidne peroksidacije i koristi se kao marker gubitka funkcije stanične membrane (Esterbauer i sur., 1991). U posljednjih 20

godina MDA je prepoznat kao važan biljeg lipidne peroksidacije. Opažen je njegov porast u pacijenata koji boluju od pojedinih bolesti (Joosten, 2001 ; Esterbauer i sur., 1991).

MDA je toksični produkt lipidne peroksidacije koji doprinosi oštećenju DNA i stvaranju mutacija. Njegova razina je povišena u serumu i tkivu pacijenata oboljelih od raka naspram zdravih kontrola. Isto je opaženo u pacijentima koji boluju od dijabetesa sa srčanom bolešću naspram dijabetičara bez srčane bolesti (Kesavulu i sur., 2001). Također povišene razine MDA primijećene su i kod Alzheimerove bolesti (Marchasson i sur., 2001). Određivanje MDA je bitno u patološkim stanjima, no također ima veliko značenje u određivanju toksikoloških efekata nekih metala, otopina i ksenobiotika, poput ugljikovog tetraklorida (De Zwart i sur., 1999), izloženosti kadmiju (Gupta i sur., 2003) i aluminijske (Abd-Elghaffar i sur., 2005).

#### **1.2.4. Oksidacijski stres i antioksidacijska obrana organizma**

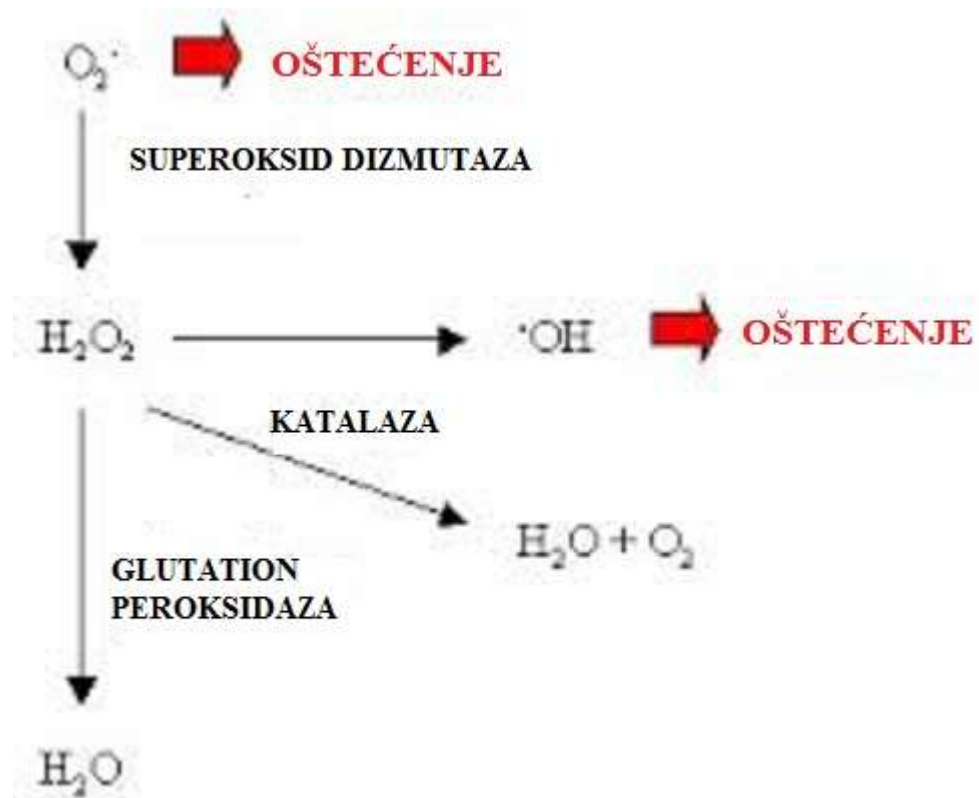
Oksidacijski stres se događa kada nakupljanje slobodnih radikala u sustavu premašuje samu sposobnost sustava da iste neutralizira i eliminira (Sies, 1985). Drugim riječima oksidacijski stres označuje pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-reducirajućim reakcijama prema oksidaciji odnosno gubitak ravnoteže stvaranja radikala i mogućnosti stanice da ih ukloni antioksidacijskim sustavima (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009). Slobodni radikali, posebice superoksid radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ) i ostale reaktivne kisikove vrste neprestano nastaju u organizmu (Sies, 1991). Za vrijeme normalnog staničnog metabolizma sustavi obrane odgovarajuće reagiraju s nastalim količinama slobodnih radikala i održava se homeostaza no, u nekim je kliničkim stanjima povećano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta tako da je kapacitet citoprotektivnih enzima i antioksidansa nedovoljan. U takvim će okolnostima prevladavati reaktivne kisikove vrste ili „oksidacijski stres“. Uzroci poremećaja ravnoteže nastajanja radikala i antioksidacijske obrane mogu biti mehanički, bakterijski, virusni, toksični, a uključuju: a) gubitak glavnine reducirajućih spojeva - antioksidansa, b) povećanje količine oksidirajućih spojeva - prooksidansa ili c) akumulaciju molekula, oštećenih i promijenjenih djelovanjem slobodnih radikala. Oksidacijski stres može dovesti do znatnog poremećaja staničnog metabolizma, uključujući prijelom strukture DNA , povećanje

unutarstaničnoga slobodnog kalcija, oštećenja membranskih ionskih transportera i proteina te peroksidaciju lipida (Čepelak i Čvorišćec, ured., 2009).

Zbog potencijalno velike mogućnosti stvaranja slobodnih radikala organizam je razvio brojne prirodne mehanizme obrane od štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta. Potencijalnu toksičnost tih vrsta u fiziološkim uvjetima sprječava velik broj citoprotektivnih enzima i antioksidansa. Antioksidansom se smatra spoj, koji prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na spoj koji se oksidira, znatno odgađa ili sprječava oksidaciju te tvari. Obrambeni sustav se sastoji od superoksid dizmutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx) i glutation reduktaze te manjih molekula poput tokoferola, askorbata, glutationa, vitamina itd (Čepelak i Čvorišćec, ured., 2009).

#### **1.2.5. Katalaza**

Katalaza je enzim prisutan u svim živim bićima kojima je potreban kisik za život (Abdul Salam i sur., 2000). Važnost katalaze je u obrani stanice od oksidativnih oštećenja uzrokovanim ROS-om (Ho i sur., 2004). Ovaj enzim je uključen u sve reakcije koje su stimulirane ROS-om zbog kojih se mijenja stanje ili aktivnost stanice poput sekrecije, produkcije enzima, genetske ekspresije itd. Enzim katalaza katalizira pretvorbu vodikovog peroksida u vodu i kisik koristeći željezo ili magnezij kao kofaktor (Chelikani i sur., 2004). Prisutnost katalaze u tkivnom uzorku može se dokazati jednostavnim testom dodavanja vodikovog peroksida i promatranjem reakcije. Stvaranje mjehurića ukazuje na pozitivan rezultat. Vodikov peroksid je štetan sekundarni produkt mnogih metaboličkih procesa te za sprječavanje oštećenja stanica i tkiva mora biti preveden u druge manje štetne supstance (Gaetani i sur., 1996). Djelovanje enzima SOD, CAT i GPx prikazano je na slici 6.



**Slika 6.** Djelovanje enzima SOD, CAT i GPx

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Posljedica lipidne peroksidacije je nastajanje nekoliko sekundarnih produkata od kojih je malondialdehid glavni i najviše istražen. Ovaj toksični aldehid se smatra biljegom procesa lipidne peroksidacije (Del Rio i sur., 2005). Katalaza je enzim prisutan u većini aerobnih stanica te ih štiti od oksidacijskog stresa na način da razgrađuje vodikov peroksid na vodu i kisik i zbog toga je katalaza važan dio obrambenog sustava organizma (Abdul Salam i sur., 2000). Literaturni podatci ukazuju da se koncentracija MDA i aktivnost katalaze određuje u uzorcima i seruma i plazme (Qin i sur., 2016; Shuangshuang i sur., 2016; Khan i sur., 2016).

Budući da je poznato da postoji razlika u vrijednostima nekih biokemijskih parametara ovisno o vrsti korištenog uzorka (serum ili plazma) ([www.synlab.hr](http://www.synlab.hr)), cilj ovog rada je utvrditi da li odabir uzoraka (serum ili plazma) i antikoagulansa utječe na izmjerenu koncentraciju MDA i aktivnost katalaze.

Prvi cilj ovog rada je odrediti vrijednosti MDA i enzima katalaze u različitim vrstama uzorka krvi; serum, EDTA plazma, citratna plazma i heparinska plazma.

Drugi cilj rada je usporediti koncentraciju MDA u uzorcima seruma, EDTA plazme, citratne plazme i heparinske plazme.

Treći cilj rada je usporediti katalitičku aktivnost katalaze u uzorcima seruma, EDTA plazme, citratne plazme i heparinske plazme.



### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. ISPITANICI**

U istraživanje je bilo uključeno 10 zdravih dobrovoljaca od čega 8 djelatnika KBC-a „Sestara milosrdnica“, 1 djelatnik i 1 student Sveučilišta u Zagrebu. Skupina ispitanika je sastavljena od 8 žena i 2 muškarca u rasponu od 23 do 40 godina. Uzorkovanje je provedeno 12. svibnja 2015. Uzorci su obilježeni rednim brojem i nisu uzimani osobni podatci dobrovoljaca.

#### **3.2. UZORCI**

Uzorci krvi uzimani su od dobrovoljaca u KBC-u „Sestara milosrdnica“ u Zagrebu u vremenu od 9 do 11 sati u ambulanti Kliničkog zavoda za kemiju. Uzorci su uzimani u standardne vakuum spremnike s antikoagulansom  $K_3EDTA$  (etilendiaminotetraoctena kiselina), citratom i heparinom. Svakom ispitaniku je uzeto 4 epruveta krvi od čega 3 epruvete s navedenim antikoagulansom i jedna bez antikoagulanasa iz koje smo dobili uzorke seruma. Uzorci krvi su centrifugirani 10 min na 200 g (500 okretaja/min) na temperaturi od 20 °C, nakon čega je odvojen gornji dio supernatanata. Uzorci su do izvođenja analize pohranjeni na -20 °C.

### 3.3. KEMIČALIJE I OTOPINE

#### 3.3.1. Kemikalije

- kalijev dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck, Darmstadt, Njemačka
- kalijev hidroksid, KOH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- metanol HPLC čistoće, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- fosforna kiselina,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , min 85 %, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 2-tiobarbituratna kiselina (TBA), Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- standard malondialdehid (MDA), Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- vodikov peroksid,  $\text{H}_2\text{O}_2$  otopina p.a., 30 %-tna otopina, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Sve korištene kemikalije bile su stupnja čistoće *pro analysi*, a metanol za mobilnu fazu HPLC čistoće.

#### 3.3.2. Otopine

##### 3.3.2.1. Postupak priprave otopina za određivanje MDA

0,1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – 0,1%-tna otopina  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pripremljena je razrjeđivanjem 1%-tne otopine  $\text{H}_3\text{PO}_4$  10 puta. 1%-tna otopina  $\text{H}_3\text{PO}_4$  dobivena je nadopunjavanjem 1,18 mL 85%-tne  $\text{H}_3\text{PO}_4$  s destiliranom vodom do oznake u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopina 0,1%-tne  $\text{H}_3\text{PO}_4$  korištena je kako bi se postigao kiseli medij za odvijanje reakcije.

0,6% TBA – 0,6%-tna otopina TBA dobivena je otapanjem 0,3 g TBA u 50 mL destilirane vode. S obzirom da se TBA teško otapa, otapanje je ubrzano zagrijavanjem u vodenoj kupelji. Ova otopina služila je kao reagens za određivanje MDA.

Mobilna faza – Za dobivanje adekvatne polarnosti, mobilna faza za HPLC sastojala se od 50 mmol/L otopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i metanola HPLC čistoće u omjeru 60:40. Da bi se dobilo 50 mmol/L otopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , otopljeno je 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u 1 L ultra čiste vode te u tako pripremljenoj otopini pH je podešen na 6,8 pomoću 5 mol/L otopine kalijevog hidroksida (KOH). Prije HPLC analize mobilna faza je profiltrirana kroz celuloza-acetat filter papir veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$  kako bi se uklonio višak otopljenog zraka i ostale nečistoće koje bi mogle oštetiti kolonu.

Standardi za MDA - Matična otopina standarda MDA priređena je razrjeđivanjem 25  $\mu\text{L}$  otopine MDA koncentracije  $6,07 \times 10^{-3}$  mol/L u 50 mL destilirane vode. Koncentracija tako priređene matične otopine bila je 3,035 mM. Napravljeno je pet razrjeđenja uz pomoć kojih smo kreirali baždarni dijagram. Način priprave prikazan je u sljedećoj tablici 2:

**Tablica 2.** Koncentracije standarda MDA

Koncentracije standarda MDA ( $\mu\text{M}$ )	Priprema otopina standarda
3,03	50 $\mu\text{L}$ matične otopine destiliranom vodom napuniti do 50mL
1,5	5 mL standarda koncentracije 3,03 $\mu\text{M}$ nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL
1,0	3,3 mL standarda koncentracije 3,03 $\mu\text{M}$ nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL
0,6	2 mL standarda koncentracije 3,03 $\mu\text{M}$ nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL
0,3	1 mL standarda koncentracije 3,03 $\mu\text{M}$ nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL
0,1	5 mL standarda koncentracije 1,5 $\mu\text{M}$ nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL

### 3.3.2.2. *Postupak priprave otopina za određivanje enzima Katalaza*

Kalijev fosfatni pufer - Na poluautomatskoj vagi izvagano je 68,05 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , koji je potom prenesen u Erlenmayerovu tikvicu te se ona nadopuni destiliranom vodom do oznake 500 mL. Otopina je promiješana i dobivena koncentracija odgovara iznosu od 1 mol/L. Potom je izvagano 87,05 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  te se ponavlja postupak prenošenja, nadopune i miješanja. Dobivena otopina ima također koncentraciju od 1 mol/L. Miješanjem 1 mol/L otopine  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i 1 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  priredili smo kalijev fosfatni pufer. Da bi pH otopine bio 7,0 korišten je pH metar za praćenje miješanja otopina.

Vodikov peroksid – iz 30%-tne otopine vodikova peroksida uzima se volumen od 0,34 mL da bi se dobila otopina koncentracije 30 mmol/L koju potom razrjeđujemo prethodno pripremljenim kalijevim fosatnim puferom na način da dopunimo do oznake 100 mL na Erlenmayerovoj tikvici.

### **3.4. APARATURA**

- analitička vaga, ALC, Acculab, Njemačka
- pH metar, MP220, Mettler Toledo, Švicarska
- termoblok, G-Therm 035, Galli Fratelli, Italija
- miješalica, Vortex-Genie model K-550-GE, Scientific industries, inc., Bohemia, N.Y. 11716, SAD
- centrifuga, Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- spektrofotometar, Agilent 8453 sa Softwerom, Agilent Tehnologies, SAD

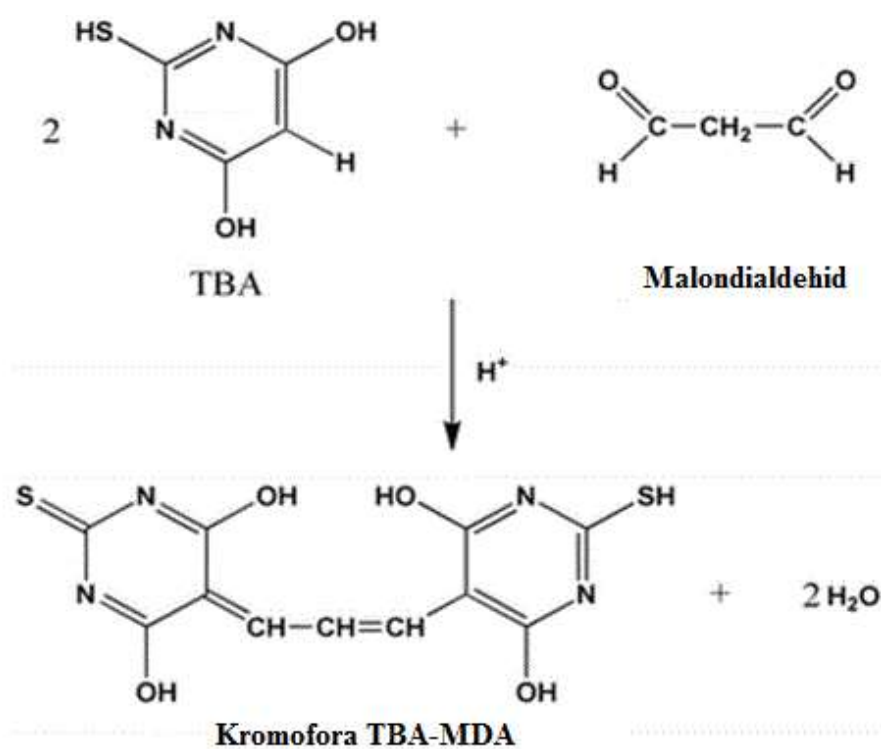
#### **3.4.1. Dijelovi korištenog HPLC-a**

- izokratna pumpa, model 64, Knauer, Berlin, Njemačka
- FL detektor, model F 1000, Hitachi Merck, Darmstadt, Njemačka
- manualni injektor (Rheodyne 7010) s 100  $\mu$ L lupom, Njemačka
- analitička kolona dimenzija 125,0x4,0 mm s predkolonom 4,0x4,0 mm, obje s veličinom punila 5  $\mu$ m, LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Njemačka
- softver Eurochrom 2000 Software, Knauer, Berlin, Njemačka

### 3.5. METODE

#### 3.5.1. Princip metode određivanja MDA

MDA reagira s tiobarbituratnom kiselinom (TBA) u kiselim uvjetima u omjeru 1:2 pri čemu nastaje crveno obojeni kompleks MDA-TBA<sub>2</sub> (Slika 7). Za mjerenje količine MDA koristimo HPLC koji uz pomoć fluorescentnog detektora određuje kompleks MDA-TBA kvantifikacijom intenziteta emitirane svjetlosti odnosno fluorescencije koja potječe od TBA.



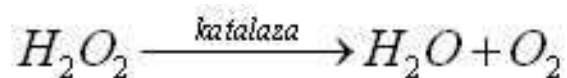
Slika 7. Reakcija između MDA i reagensa TBA

### 3.5.2. Postupak određivanja MDA

U Eppendorf epruvete stavljeno je po 50  $\mu\text{L}$  destilirane vode ili standarda. Prije stavljanja po 50  $\mu\text{L}$  uzoraka u epruvete, oni su razrijeđeni pet puta. Potom je u Eppendorf epruvete dodano 100  $\mu\text{L}$  TBA i 400  $\mu\text{L}$  0,1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Smjese u epruvetama su kratko promiješane te zagrijavane u termo bloku 30 minuta na 90 °C. Nakon zagrijavanja, da bi zaustavili reakciju, epruvete su stavljene na led. Svaki uzorak rađen je u duplikatu, a za svaku seriju uzoraka napravljena je i serija standarda te slijepa proba s vodom. Neposredno prije analize na HPLC-u uzorci su kratko centrifugirani, a 100  $\mu\text{L}$  supernatanta injektirano je u HPLC. Protok mobilne faze bio je podešen na 0,5mL/min, a valne duljine detektora na  $\lambda=527$  nm za ekscitaciju i  $\lambda=553$  za emisiju. Ukupna analiza trajala je 30 min za svaki uzorak, a uzorci su prolazili kroz analitičku kolonu na kojoj se MDA zadržavao oko 5,5 min. Koncentracija MDA u uzorcima izračunata je pomoću baždarnog dijagrama standarda poznate koncentracije, a u račun su uzeta u obzir razrijeđenja uzoraka. Koncentracija MDA izražena je u  $\mu\text{mol/L}$ .

### 3.5.3. Princip metode određivanja enzima katalaza

Katalaza u uzorku razgrađuje dodanog  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a razgradnja istog se prati pri 240 nm i pri temperaturi od 25 °C. Katalitičku aktivnost enzima određujemo računski uz pomoć razlike apsorbancije na početku ( $t=0$ ) i na kraju mjerenja ( $t=30$ ) (Aebi H. 1984). Koristeći Beer Lambertov zakon, uz poznavanje razlike apsorbancije, debljine kivete (1 cm) te molarni ekstincijski koeficijent ( $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), određujemo koncentraciju enzima katalaza. Razlika u apsorbanciji, količina razgrađenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  te koncentracija enzima katalaza u uzorku proporcionalne su. Reakcija razgradnje vodikovog peroksida uz enzim Katalaza prikazana je jednadžbom kemijske reakcije na slici 8 :



**Slika 8.** Reakcija razgradnje vodikovog peroksida uz enzim katalaza

#### **3.5.4. Postupak određivanja enzima katalaza**

Svi uzorci su prije i tokom spektrofotometrijskog mjerenja čuvani na ledu kako se aktivnost enzima ne bi promijenila. Slijepa proba uzorka priredila se miješanjem 1,0 mL uzorka sa 0,5 mL kalij fosfatnog pufera (pH=7). Svaki uzorak je rađen u duplikatu na način da se 1,0 mL uzorka pomiješao sa 0,5 mL vodikovog peroksida. Apsorbancija svakog uzorka mjerena je prema slijepoj probi istog uzorka.

### **3.6. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA**

Statistička obrada podataka provedena je pomoću statističkog programskog paketa SigmaStat 3.0 za Windows. Rezultati analize su prikazani u obliku medijana i interkvartilnog raspona između prvog i trećeg kvartila. Za testiranje značajnosti razlike između skupina brojčanih podataka korišteni su neparametrijski testovi: Kruskal-Wallisov test i Dunn-ova metoda za *post-hoc* testiranje. Vrijednost  $P < 0,05$  smatrana je statistički značajnom.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Za razliku od reaktivnih kisikovih spojeva i lipid-peroksil radikala, MDA ima dulje vrijeme poluživota te se može širiti po organizmu izazivajući oštećenja na mjestima udaljenim od inicijalnog oksidacijskog događaja. MDA je zbog svoje relativne stabilnosti ujedno glavni i najviše istražen produkt peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina (Del Rio i sur., 2005;Nielsena i sur., 1997).

Enzim katalazu sadrže svi peroksisomi, stanične organele eukariota obavijene membranom čija je zadaća između ostalog i razgradnja vodikova peroksida, potencijalno opasne molekule za stanicu. Vodikov peroksid nastaje u reakcijama enzimatske oksidacije staničnih spojeva unutar peroksisoma. Reakcija disproporcioniranja kojom katalaza razgrađuje molekule vodikova peroksida do vode i molekularnog kisika, važna je za zaštitu organizma (Cooper, 2000 ; Čepelak i Čvorišćec, ured., 2003).

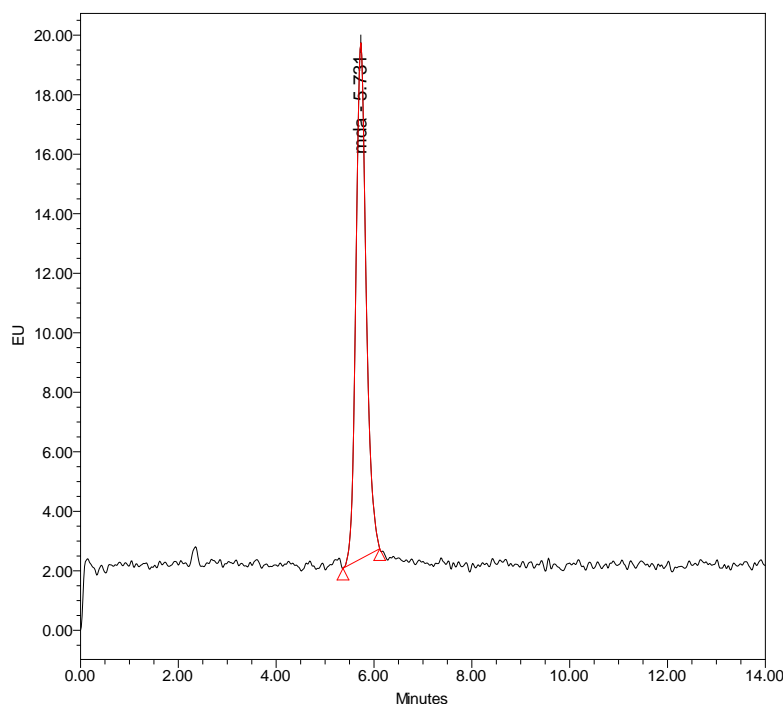
Za biokemijsku analizu krvi osim seruma dostupni su uzorci plazme u kojima se koriste antikoagulansi poput EDTA, citrata i heparina. Pojedini antikoagulansi mogu imati značajan utjecaj na vrijednosti biokemijskih parametara koji se određuju (Belić i sur., 2015). Odabir uzoraka za daljnju analizu može biti jedan od ključnih predanalitičkih koraka prilikom mjerenja određenog analita. Za određivanje koncentracije MDA i katalitičke aktivnosti katalaze vidljivo je iz dostupne literature da se u istraživanjima koriste i uzorci seruma i uzorci plazme (Qin i sur., 2016;Shuangshuang i sur., 2016;Khan i sur., 2016).

Cilj ovog rada bio je odrediti i usporediti koncentracije MDA u uzorcima seruma, EDTA plazme, heparinske plazme i citratne plazme te utvrditi postoji li statistički značajna razlika između izmjerenih koncentracija. Također je cilj rada bio i određivanje katalitičke aktivnosti katalaze u uzorcima seruma, EDTA plazme, heparinske plazme i citratne plazme te utvrđivanje eventualnog postojanja statistički značajne razlike između izmjerenih koncentracija.

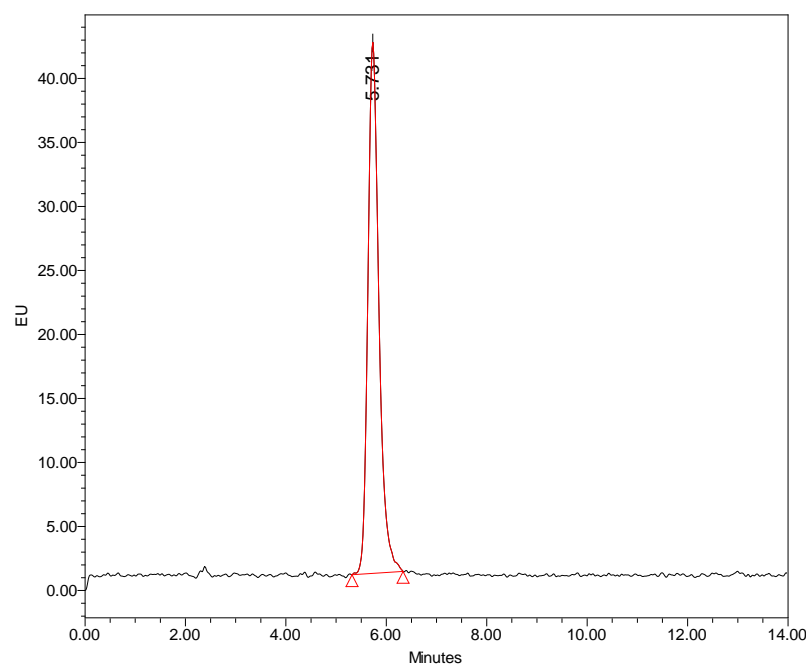
#### 4.1. Rezultati određivanja MDA

Za pouzdano, osjetljivo i specifično mjerenje MDA u uzorcima seruma i plazme uzete na različite antikoagulanse, korištena je metoda HPLC. Metoda je prethodno validirana. Na uređaju za HPLC prvo je izmjeren pozadinski šum uz pomoć slijepe probe (blank) gdje je umjesto uzorka korištena ultra čista voda. Vrijednosti mjerenja svih uzorka su korigirane za vrijednost slijepe probe da bi izbjegli lažno povišene rezultate zbog fluorescencije reagensa TBA.

Izmjerene su površine pikova svih pet prethodno pripremljenih standarda. Površina pika odgovara koncentraciji MDA. Na slikama 10 i 11 prikazani su kromatogrami standarda MDA koncentracija 0,1  $\mu\text{mol/L}$  i 0,3  $\mu\text{mol/L}$ .

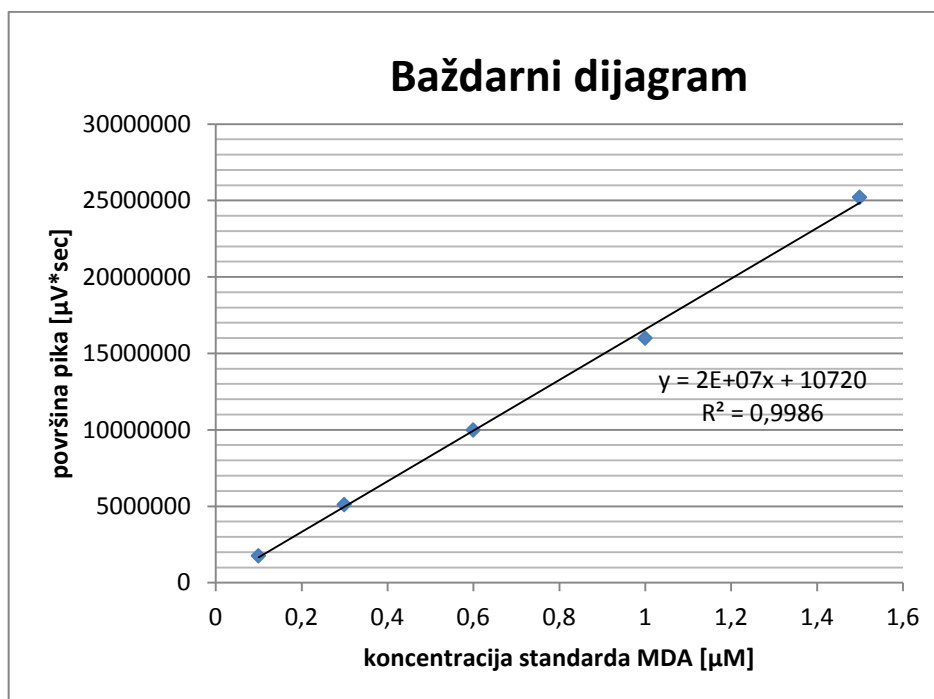


**Slika 10.** Kromatogram standarda MDA koncentracije 0,1  $\mu\text{mol/L}$



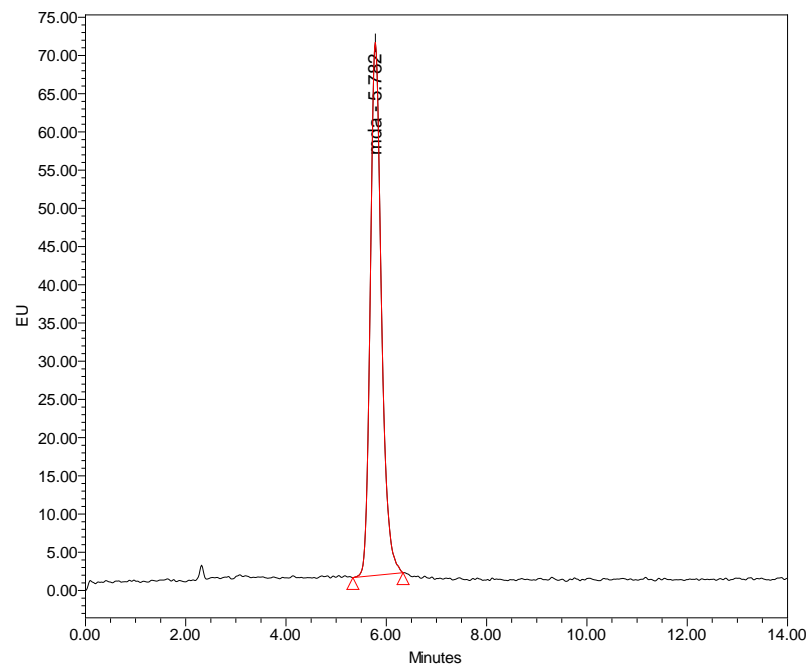
**Slika 11.** Kromatogram standarda MDA koncentracije 0,3 µmol/L

Na temelju poznate koncentracije pripremljenih standarda MDA i površine pikova očitanih sa kromatograma, priređuje se baždarni dijagram. On prikazuje ovisnost koncentracije MDA o površini signala. Baždarni dijagram bio je linearan, koeficijent linearnosti  $R^2$  bio je 0.9986 a jednačba pravca  $y = 2E+07x + 10710$  (Slika 12).

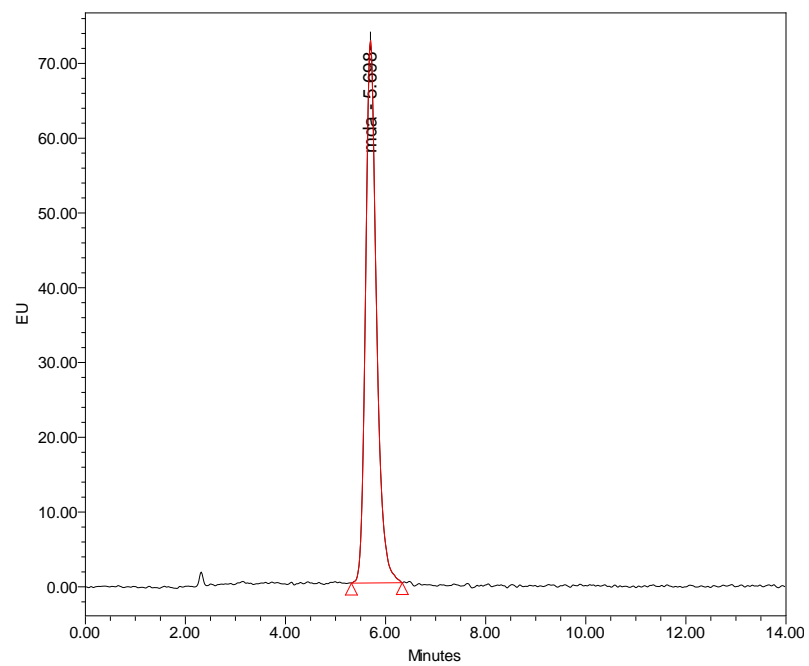


**Slika 12.** Baždarni pravac ovisnosti površine pika o koncentraciji MDA

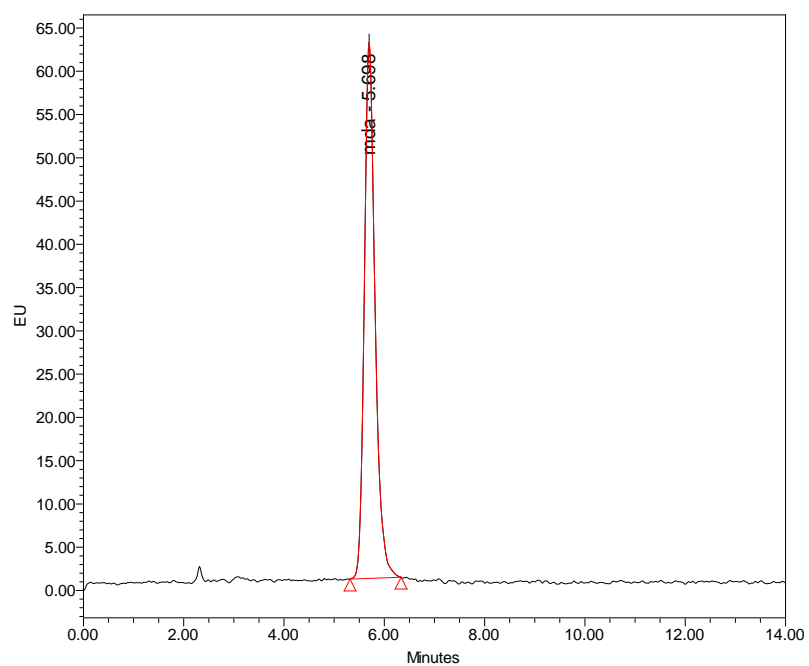
Analize uzoraka nepoznate koncentracije MDA napravljene su nakon izvršene validacije te utvrđene linearnosti metode. Na slikama 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 prikazani su kromatogrami jednog uzorka seruma u duplikatu te uzorka EDTA plazme u duplikatu, citratne plazme u duplikatu i heparinske plazme u duplikatu.



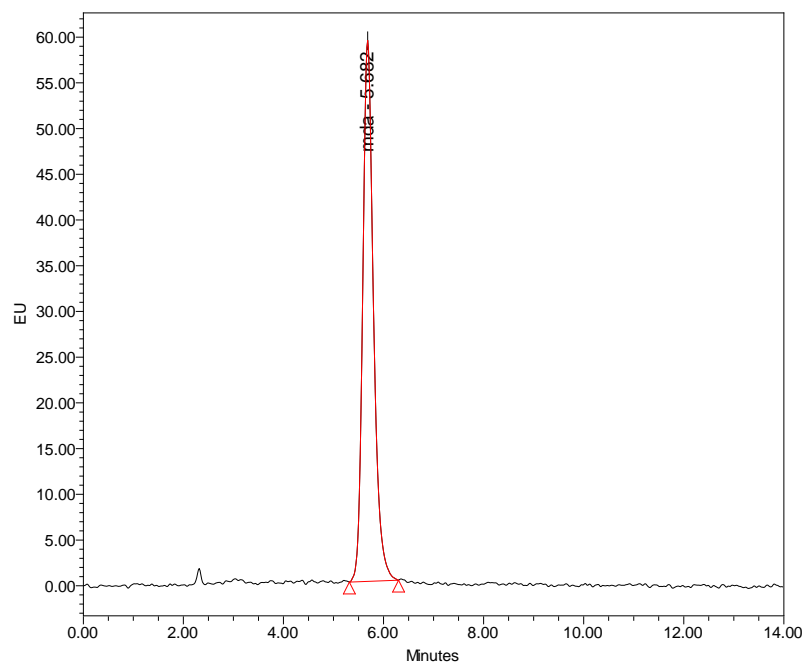
**Slika 13.** Kromatogram uzorka koji sadrži serum



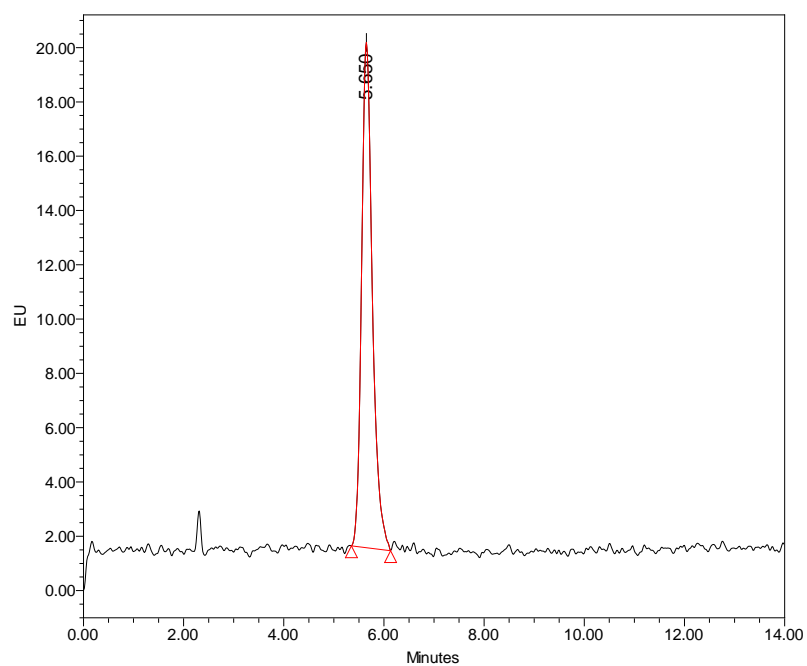
**Slika 14.** Kromatogram uzorka koji sadrži serum, duplikat



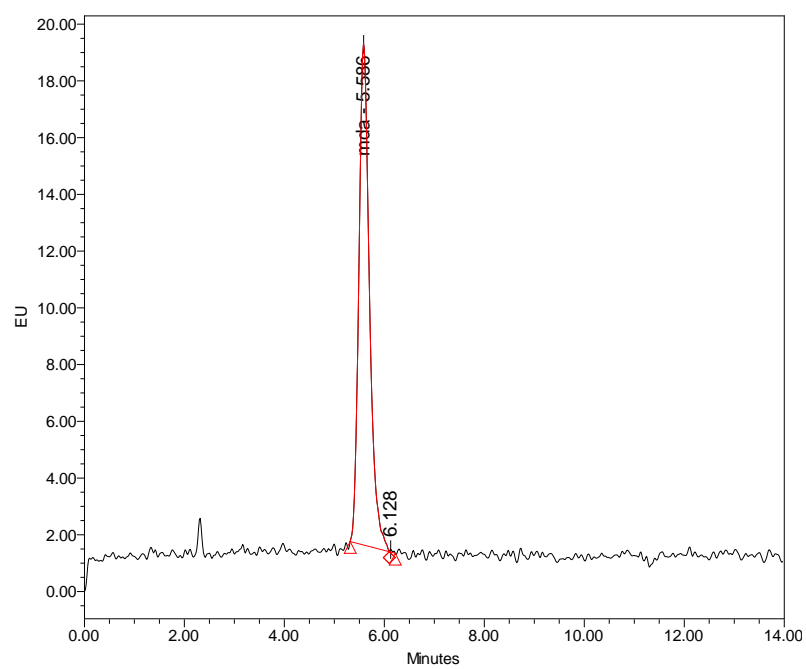
**Slika 15.** Kromatogram uzorka koji sadrži antikoagulans EDTA



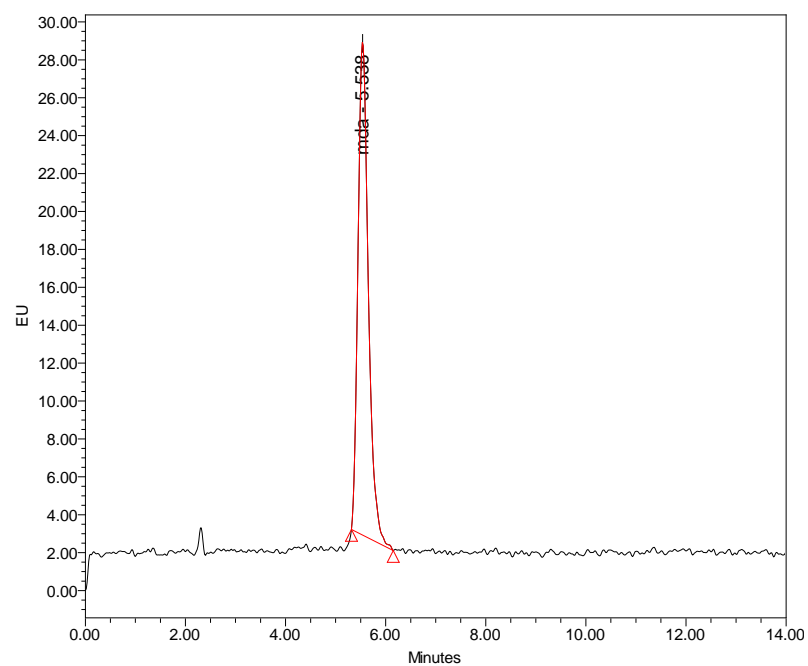
**Slika 16.** Kromatogram uzorka koji sadrži antikoagulans EDTA, duplikat



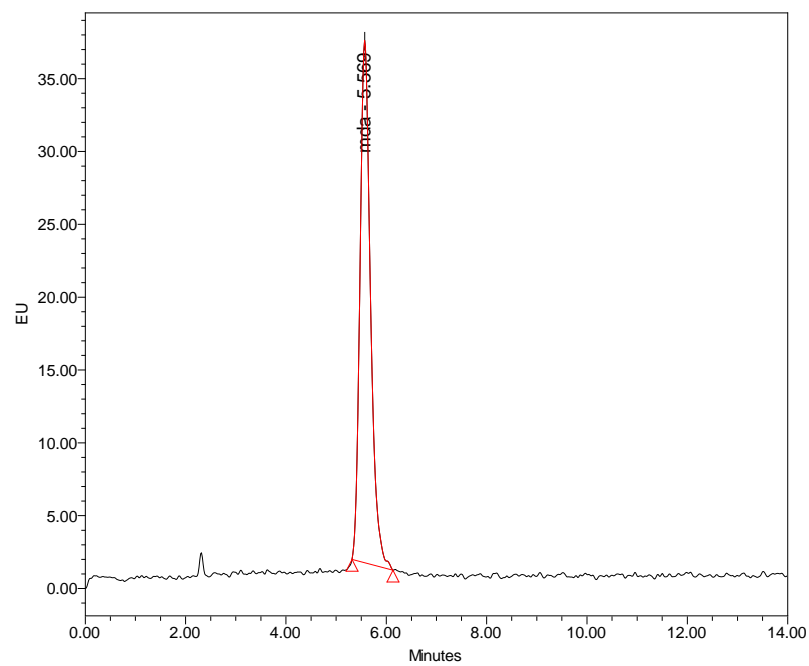
**Slika 17.** Kromatogram uzorka koji sadrži antikoagulans citrat



**Slika 18.** Kromatogram uzorka koji sadrži antikoagulans citrat, duplikat



**Slika 19.** Kromatogram uzorka koji sadrži antikoagulans heparin



**Slika 20.** Kromatogram uzorka koji sadrži antikoagulans heparin, duplikat



HPLC metoda je osjetljiva i primjenjiva za uzorke u kojima se očekuju niže koncentracije MDA. Ova metoda je dovoljno pouzdana, brza i primjenjiva za rutinsko određivanje koncentracije MDA u biološkim uzorcima ispitanim u ovom radu (plazma, serum). Uspoređivanjem površine pikova uzoraka koji sadrže nepoznatu koncentraciju MDA sa izrađenim baždarnim dijagramom, izračunate su koncentracije MDA uz korištenje kompjuterskog softwera. Koncentracije MDA u uzorcima seruma i uzorcima EDTA plazme, citratne plazme i heparinske plazme prikazane su u tablici 3.

**Tablica 3.** Koncentracije MDA u uzorcima seruma i uzorcima EDTA plazme, citratne plazme i heparinske plazme

	MDA [ $\mu\text{mol/L}$ ]	P
<b>serum</b>	1,997 (1,693 - 2,074)	<0,001
<b>EDTA</b>	2,604 (2,040 - 3,415)	
<b>citrat</b>	0,757 (0,610 - 0,979)	
<b>heparin</b>	2,730 (2,445 - 2,976)	

Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon); testirano Kruskal-Wallisovim testom ; *Post-hoc* testiranje provedeno je Dunnovom metodom.

Najveća koncentracija MDA je u uzorku heparinske plazme [2,730 (2,445 - 2,976)  $\mu\text{mol/L}$ ], nešto niža je u uzorku EDTA plazme [2,604 (2,040 - 3,415)  $\mu\text{mol/L}$ ], još niža je u uzorku seruma [1,997 (1,693 - 2,074)  $\mu\text{mol/L}$ ] dok je najniža koncentracija izmjerena u citratnoj plazmi [0,757 (0,610 - 0,979)  $\mu\text{mol/L}$ ].

Kruskal-Wallisovim testom utvrđeno je da se koncentracija MDA značajno razlikuje između uzoraka seruma, EDTA plazme, citratne plazme i heparinske plazme. Da bismo utvrdili između kojih uzoraka postoji statistički značajna razlika provedeno je *Post-hoc* testiranje (Dunnova metoda). *Post-hoc* testiranje pokazalo je da je koncentracija MDA značajno različita između heparinske plazme i citratne plazme te između EDTA plazme i citratne plazme. Heparinska plazma sadrži veću koncentraciju MDA [2,730 (2,445 - 2,976)  $\mu\text{mol/L}$ ] u odnosu na citratnu plazmu [0,757 (0,610 - 0,979)  $\mu\text{mol/L}$ ]. EDTA plazma također sadrži veću koncentraciju MDA [2,604 (2,040 - 3,415)  $\mu\text{mol/L}$ ] naspram citratne plazme [0,757 (0,610 - 0,979)  $\mu\text{mol/L}$ ].

Svrha istraživanja bila je utvrditi dali se koncentracija MDA u istog pacijenta mijenja ovisno o tome koji antikoagulans je korišten pri uzimanju uzorka. Suttnar i suradnici su u svom istraživanju također primijetili različit utjecaj korištenog antikoagulansa pri mjerenju. U svom radu koristili su citrat i EDTA. Njihov rad pokazuje veće koncentracije MDA u citratnoj plazmi nego u EDTA plazmi (Suttnar i sur., 2001). Koncentracija MDA u plazmi mjerena različitim metodama od 1970 do 1995 varira u širokom rasponu od 0 do 50  $\mu\text{mol/L}$  (Esterbauer i sur., 1991) ukazujući na već potvrđeno od strane mnogih autora, oksidaciju uzorka tokom analize. U novije vrijeme, s poboljšanim metodama određivanja, utvrđena vrijednost MDA u zdravoj plazmi iznosi 0-1  $\mu\text{mol/L}$  no i dalje nekoliko drugih radova prijavljuje vrijednosti od 4-5  $\mu\text{mol/L}$  (Del Rio i sur., 2005). Iz tog razloga je klinički značaj MDA često kritiziran. U ovom radu i drugoj literaturi potvrđena je različitost koncentracije MDA u ovisnosti o korištenom antikoagulansu što ukazuje da treba voditi računa o odabiru uzorka za analizu. U svim uzorcima je izmjerena koncentracija MDA no između pojedinih uzoraka postoji značajna razlika u izmjerenim vrijednostima. Ovi rezultati ukazuju na to da se u uzorcima seruma, EDTA plazme, citratne plazme i heparinske plazme može određivati koncentracija MDA, ali je važno imati na umu da se usporedba rezultata može vršiti samo u istoj vrsti uzorka.

## 4.2. Rezultati određivanja enzima katalaze

Prije spektroskopskog mjerenja svakog uzorka, prvo je izmjerena apsorbancija slijepe probe istog uzorka sa dodanim puferom umjesto vodikovog peroksida u odgovarajućem volumenu. Na taj način su izbjegnute interferencije mogućih nečistoća. Svaki uzorak je izmjeran u duplikatu. Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze u uzorcima seruma i uzorcima EDTA plazme, citratne plazme i heparinske plazme prikazana je u Tablici 4. Rezultati mjerenja izraženi su u mol/L.

**Tablica 4.** Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze u uzorcima seruma i uzorcima EDTA plazme, citratne plazme i heparinske plazme

	katalaza [mol/L]	P
serum	0,0137 (0,00908 - 0,0173)	<0,001
EDTA	0,0463 (0,0439 - 0,0893)	
citrat	0,0317 (0,0156 - 0,0642)	
heparin	0,0334 (0,0163 - 0,0379)	

Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon); testirano Kruskal-Wallisovim testom ; *Post-hoc* testiranje provedeno je Dunnovom metodom

Najveća aktivnost katalaze je u uzorku EDTA plazme [0,0463 (0,0439 - 0,0893)mol/L], nešto niža je u uzorku heparinske plazme [0,0334 (0,0163 - 0,0379)mol/L], još niža u uzorku citratne plazme [0,0317 (0,0156 - 0,0642)mol/L] te najniža u uzorku seruma [0,0137 (0,00908 - 0,0173)mol/L]. Kruskal-Wallisovim testom utvrđeno je da se aktivnost katalaze značajno razlikuje između uzoraka seruma, EDTA plazme, citratne plazme i heparinske plazme. Da bismo utvrdili između kojih uzoraka postoji statistički značajna razlika provedeno je *Post-hoc* testiranje (Dunnova metoda). *Post-hoc* testiranje pokazalo je da je aktivnost katalaze značajno različita između seruma i EDTA plazme. Serum sadrži nižu aktivnost katalaze [0,0137 (0,00908 - 0,0173)mol/L] naspram EDTA plazme [0,0463 (0,0439 - 0,0893)mol/L].

U istraživanju koje su proveli Al-Abrash i suradnici potvrđeno je da nema značajne promjene aktivnosti katalaze u eritrocitima čija je vrijednost određena iz krvi vađene uz EDTA ili heparin (Abdul Salam i sur., 2000). Da nema korelacije između aktivnosti katalaze i vrste korištenog antikoagulansa, dokazuje i 1997 Anderson (Anderson i sur., 1997).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je i kod mjerenja aktivnosti katalaze prisutan značajan utjecaj odabira uzorka. Kao što je vidljivo iz rezultata, aktivnost katalaze u EDTA plazmi značajno je veća nego u uzorku seruma. U svim korištenim uzorcima moguće je izmjeriti aktivnost katalaze, ali kao i u slučaju MDA, vrijednosti se mogu uspoređivati samo između iste vrste uzorka.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja moguće je zaključiti sljedeće:

1. Rezultati ispitivanja pokazuju da je kod mjerenja koncentracije MDA prisutan značajan utjecaj odabira uzorka (serum, EDTA plazma, citratna plazma, heparinska plazma).
2. Koncentracija MDA značajno se razlikuje između uzorka citratne plazme i heparinske plazme te između EDTA plazme i citratne plazme.
3. Rezultati mjerenja aktivnosti katalaze pokazuju također značajan utjecaj odabira uzorka (serum, EDTA plazma, citratna plazma, heparinska plazma).
4. Aktivnost katalaze značajno se razlikuje između uzorka seruma i EDTA plazme.
5. Usporedba koncentracije MDA i aktivnosti katalaze moguća je samo između iste vrste uzoraka.

## 6. LITERATURA

Abd-Elghaffar SK, El-Sokkary GH, Sharkawy AA. *Neuro Endocrinology Letters*, 2005, 26, 609

Abdul Salam AA, Faizeh AA, Ghad NA. Catalase evaluation in different human diseases associated with oxidative stress. *Saudi Medical Journal*, 2000, 21(9), 826-830

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 1984, 501, 121-126

Anderson HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandien P. Antioxidative enzymes in human erythrocytes. *Clin Chem*, 1997, 43, 562-568

Belić B, Cincović MR, Došenović M, Stojanović D, Kovačević Z. Utjecaj različitih antikoagulansa na vrednosti biohemijskih parametara u krvi kod krava. *Vet glas*, 2015, 69, 13-20

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Clinical Chemistry and molecular diagnosis. St. Louis, Elsevier Saunders, 2012, str.151-153

Bukan N, Sancak B, Yavuz O, Koca C, Tuken F, Ozcelikay AT, Altan N. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J Biochem Biophy*, 2000, 40(6), 447-450

Chelikani P, Fita I, Loewer PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences*. 2004, 61(2), 192-208

Cooper GM. Cell. In Bennet R (editor). Functions of peroxisomes. *Washington D.C. ASM Press Sinauer Associates*, 2003, 414

Čvorišćec D, Čepelak I, (urednice). Štrausova medicinska biokemija. Oksidacijski stres i značenje u patološkim stanjima. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str.639-645

De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26, 202

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2005, 15, 316

Esterbauer H, Shaur RJ, Zollner H. *Free Radical Biol. Med*, 1991, 11, 81

Gaetani GF, Farraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirman HN. Predominant role of catalase in the disposal of Hydrogen peroxide within human Erythrocytes. *Blood*, 1996, 87(4), 1595-1599

Gupta RS, Gupta ES, Dhakal BK, Thakur AR, Ahnn J. *Molecular Cells*. 2003, 17, 132

Ho YS, Xiong Y, MA W, Spector A, Ho DS. Mice Lacking Catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *The journal of biological chemistry*. 2004, 279(31), 32804-32812

Joosten E. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2001. 39, str.717

Kesavulu MA, Rao BK, Giri R, Vijaya J, Subramanyam G, Apparao C. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2001, 53, str 33

Khan SA, Choudhary R, Singh A, Bodakhe SH. Hypertension potentiates cataractogenesis in rat eye through modulation of oxidative stress and electrolyte homeostasis. *J.Curr Ophthalmol*, 2016, 28(3), 123-130

- Kujundžić M. I suradnici. Klinička patofiziologija za studente farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Patofiziologija krvi i krvotvornih organa, FBF, Zagreb, 2003, str. 11
- Labar B, Hauptmann E i suradnici, Hematologija. Školaksa knjiga, Zagreb, 2007, str.67;388
- Marchasson IB, Beauvieux MCD, Peuchant E, Harston SR, Decamps A, Reigner B, Emeriau JP, Rainfray M. Age ageing. 2001, 30, 235
- Nielsena F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyd as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, 1997, 43, 1209-1214
- Qin C, Rong JL, Xuchu H, lin Y, Qichang L. Treatment and prevention od inflammatory responses and oxidative stress in patients with obstructive aleep apnea hypopnea syndrome using Chinese herbal medicines. *Exp Ther Med*, 2016, 12(3), 1572-1578
- Shuangshuang Z, Xiangdong L, Lihong M, Hongfeng W, Fang F. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits imiquimod-induced psoriasis-like inflammation of BALB/c mice. *BMC Complement, Altern Med*, 2016, 16(1), 334
- Sies H. Oxidative stress. San Diego, Academic Press, str.1-8
- Sies H (editor). Oxidative stress, oxidants and antioxidants. New York, Academic Press, 1991
- Suttnar J, Masova L, Dyr JE,. Influence of citrate and EDTA anticoagulans on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 751, 193-197



## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Glavni i najistraženiji produkt lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA), čija koncentracija ujedno ukazuje i na oksidativni stres organizma koji za posljedicu ima prekomjerno nakupljanje toksičnih reaktivnih kisikovih spojeva (ROS).

Enzim katalaza spada u antioksidacijske enzime koji predstavljaju sekundarnu obranu organizma od reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), stoga njegova katalitička aktivnost također ukazuje na stanje oksidativnog sresa.

Poznato je da se vrijednost nekih biokemijskih parametara mijenja ovisno o korištenom uzorku (serum ili plazma) ili korištenom antikoagulansu u uzorku plazme, stoga je cilj ovog rada bio utvrditi da li je pri mjerenju parametara oksidacijskog stresa irelevantan odabir uzorka (serum ili plazma) i antikoagulansa. U ovom radu mjerene su koncentracije oba parametra u uzorku seruma, EDTA plazme, citratne plazme i heparinske plazme.

Rezultati ispitivanja pokazuju da se koncentracije MDA statistički značajno razlikuju između citratne plazme i heparinske plazme te između EDTA plazme i citratne plazme. Aktivnost katalaze se statistički značajno razlikuje između seruma i EDTA plazme.

Dobiveni rezultati ukazuju da se izmjerena koncentracija MDA i aktivnost katalaze razlikuje između različitih vrsta uzoraka te da je usporedba rezultata moguća samo između istih tipova uzoraka.

Malondialdehyde is the main and most researched product of lipid peroxidation. Its concentration indicates oxidative stress in the body that leads to the generation of toxic reactive oxygen species (ROS).

Catalase is a very important enzyme in protecting the cell from oxidative damage by Reactive Oxygen Species (ROS), so its level also indicates oxidative stress.

It is well known that some biochemistry parameters have different value depending on which sample is been used (serum or plasma) or which anticoagulant agent was used to collect the blood samples. Therefore, the main objective of this work was to establish whether or not there was a difference between the values of MDA and catalase measured in different samples ( serum, EDTA plasma, citrate plasma or heparin plasma).

The results show that there is a statistically significant difference of MDA between citrate plasma and heparin plasma, also in EDTA plasma and citrate plasma. It is also shown that there is a statistically significant difference of catalase between serum and EDTA plasma.

The results indicate that the measured concentration of MDA and catalase activity varies between different types of samples and that the comparison of the results is possible only between the same types of samples.

## Koncentracija malondialdehida i katalitička aktivnost katalaze u uzorku seruma, EDTA, citratne i heparinske plazme

Barbara Marić

Glavni i najistraženiji produkt lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA), čija koncentracija ujedno ukazuje i na oksidativni stres organizma koji za posljedicu ima prekomjerno nakupljanje toksičnih reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Enzim katalaza spada u antioksidacijske enzime koji predstavljaju sekundarnu obranu organizma od reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), stoga njegova katalitička aktivnost također ukazuje na stanje oksidativnog sresa. Poznato je da se vrijednost nekih biokemijskih parametara mijenja ovisno o korištenom uzorku (serum ili plazma) ili korištenom antikoagulansu u uzorku plazme, stoga je cilj ovog rada bio utvrditi da li je pri mjerenju parametara oksidacijskog stresa irelevantan odabir uzorka (serum ili plazma) i antikoagulansa, ili postoji li razlika u vrijednostima istih. U ovom radu mjerene su koncentracije oba parametra u uzorku seruma, EDTA plazme, citratne plazme i heparinske plazme. Rezultati ispitivanja pokazuju da se koncentracije MDA statistički značajno razlikuju između citratne plazme i heparinske plazme te između EDTA plazme i citratne plazme. Aktivnost katalaze se statistički značajno razlikuje između seruma i EDTA plazme. Dobiveni rezultati ukazuju da se izmjerena koncentracija MDA i aktivnost katalaze razlikuje između različitih vrsta uzoraka te da je usporedba rezultata moguća samo između istih tipova uzoraka.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 39 stranica, 20 grafičkih prikaza, 4 tablice i 28 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Oksidacijski stres, lipidna peroksidacija, malondialdehid, katalaza, serum, plazma, antikoagulans

Mentori: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docentica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, *izvanredna profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docentica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, *izvanredna profesorica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

**Dr. sc. Suzana Inić**, *docentica, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Rad prihvaćen: rujan 2016.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of medicinal biochemistry and hematology  
Department of Analytical Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Concentration of malondialdehyde and catalytic activity of catalase in serum, EDTA, citrate and heparin plasma samples

Barbara Marić

Malondialdehyde is the main and most researched product of lipid peroxidation. Its concentration indicates oxidative stress in the body that leads to the generation of toxic reactive oxygen species (ROS). Catalase is a very important enzyme in protecting the cell from oxidative damage by Reactive Oxygen Species (ROS), so its level also indicates oxidative stress. It is well known that some biochemistry parameters have different value depending on which sample is been used (serum or plasma) or which anticoagulant agent was used to collect the blood samples. Therefore, the main objective of this work was to establish whether or not there was a difference between the values of MDA and catalase measured in different samples (serum, EDTA plasma, citrate plasma or heparin plasma). The results show that there is a statistically significant difference of MDA between citrate plasma and heparin plasma, also in EDTA plasma and citrate plasma. It is also shown that there is a statistically significant difference of catalase between serum and EDTA plasma. The results indicate that the measured concentration of MDA and catalase activity varies between different types of samples and that the comparison of the results is possible only between the same types of samples.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 39 pages, 20 figures, 4 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Oxidation stress, lipid peroxidation, malondialdehyde, catalase, serum, plasma, anticoagulant agent

Mentors: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

Reviewers: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

**Suzana Inić, Ph.D.** *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

The thesis accepted: September 2016.

